Aus dem Hygienischen Institut der Universität Würzburg.
Vorstand: Prof. Dr. M. Knorr.

Über den Antagonismus bei Bakterien

Inaugural-Dissertation

verfaßt und

einer Hohen Medizinischen Fakultät

der

Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

zur

Erlangung der Doktorwürde in der Medizin

vorgelegt von

René Schubert

1936

Dissertationsdruckerei und Verlag Konrad Triltsch, Würzburg.

Gedruckt mit Genehmigung der Mediz. Fakultät.

Referent: Prof. Dr. M. Knorr.

R. UNIV.
BIBLIOTHEEK
LEIDEN

Über den Antagonismus bei Bakterien.

Die Beobachtung eines antagonistischen Verhaltens verschiedener Bakterien machte Pasteur 1877. Bakterielle Infektionen schienen durch gleichzeitige Infektion mit anderen Erregern günstig beeinflußt zu werden. Es findet eine Hemmung des Wachstums des einen Stammes durch Wirkung des hinzutretenden statt.

Die große praktische Bedeutung dieser Erfahrungstatsache trat hervor, als Cantani als erster therapeutische Folgerungen zog.

Es erscheint zweckmäßig, in diesem Sinne die Basis der Kenntnisse über den Bakterienantagonismus durch weitgehende Versuche zu festigen, wobei sich eine einheitliche Erklärung des Begriffes „Antagonismus" als unbedingt notwendig erweist. Wie Gotschlich darlegt, ist hierunter lediglich eine Hemmung der Entwicklung von Mikroorganismen durch gleichzeitige Anwesenheit eines andersartigen Erregers zu verstehen, nicht aber Abtötung.

Gelegentlich anderer Versuche war aufgefallen, daß der von Gundel und seinen Mitarbeitern beschriebene Antagonismus des Bact. coli gegenüber Milzbrand teilweise überhaupt nicht, teilweise nur angedeutet und sehr selten so vorhanden ist, wie er beschrieben wurde.

Es war dies um so auffallender, als die Ergebnisse von Gundel von verschiedenen Autoren teilweise oder ganz bestätigt wurden.

Wir glauben, daß die in diesem gesamten Schrifttum aufgetretenen Schwierigkeiten durch die Verquickung des Wortes Antagonismus mit Abtötung zustandegekommen sind. In den wesentlichen Arbeiten über diese Frage von Gundel und Habs wird sogar von der restlosen Abtötung aller Milzbrandkeime in Nährflüssigkeiten berichtet: „Meistens können wir nach 4—8 Tagen keine lebenden Milzbrandbazillen mehr in der Kultur nachweisen ...."

Auch auf Nährböden soll der Antagonismus so weit gehen, daß schließlich die zuerst im Colirasen gewachsenen Milzbrandkeime abgetötet werden: „säht man in eine 24stünd. dichte Colikultur von irgendeinem festen Nährboden Milzbrandbazillen hinein, so ist in keinem Falle ein Angehen auch nur einer Milzbrandkolonie zu beobachten."

Freilich weist Gundel auf verschiedene Ausnahmen bzw. Versuchsfehler hin, z. B. auf die, daß in einer Nährbrühe, die mit Coli und Milzbrand beimpft wurde, Milzbrandklümpchen zur Aussaat kommen, in denen natürlich Sporen sich als geschützt erweisen mußten.

Wir haben Gundel von unseren vielfachen abweichenden Beobachtungen berichtet. Gundel glaubt, daß unsere abweichenden Ergebnisse an den Colistämmen liegen, die frisch sein müßten.

Wir haben in unseren Versuchen mit 9 frischen Stämmen, 2 Wasser- und 7 Menschenstämmen, gearbeitet und nicht gesehen, daß sie sich im Laufe der Zeit, als wir sie im Versuch ließen, je anders verhielten als frisch gezüchtete. Nebenbei bemerkt sei, daß sämtliche Stämme bis auf einen hämolysierten.

Auch die 7 Milzbrandstämme, die mit diesen Colistämmen in den Versuch gestellt wurden, waren genauestens geprüft, auch auf Tierpathogenität; einer stammt frisch von einem gefallenen Rind. Er verhielt sich genau so wie die Laboratoriumsstämme.

Unsere Versuche wurden so angestellt, daß jeder Colistamm mit sämtlichen Milzbrandstämmen in der jeweiligen Versuchsanordnung geprüft wurde (= 63 Einzelversuche = ein Hauptversuch).

Die Ursache des Antagonismus, unter dem wir also Hemmung, nie Tötung verstehen, ist nach Sanfelice (1933) unbekannt. Er vermutet, daß das Colibakterium imstande ist, ein Enzym zu liefern, welches eine antagonistische Wirkung gegenüber den Milzbrandbazillen ausübt. Gundel und Wagner konnten aber aus Colikulturen Lipoide herstellen, die Milzbrandbazillen spätestens in 3 Stunden töteten. Sie nehmen an, daß das baktericide Vermögen der Bakterienlipoide eine Wirkung des Gehaltes an Fettsäure ist. Es wäre demnach nicht mehr von Coliantagonismus, sondern von Colibakterizidie zu sprechen.

Eigene Versuche.

1. Sogen. Gitterplatten.

Durch 3 Milzbrandstriche werden 3 Colistriche gezogen. Eigentlich sollten die verhältnismäßig wenigen, mitgerissenen Milzbrandbazillen erst nach der Passage des dritten Milzbrandstriches reichlicher zu erwarten sein. Aber schon nach 24stünd. Bebrütung bei 37° zeigt sich, daß durchwegs nach Passieren des ersten Milzbrandstriches deutlich h ö r n c h e n f ö r m i g die Milzbrandbazillen aus dem Colirasen wachsen. Die ungleichen Aussaatmengen Milzbrand — Coli lassen unseres Erachtens diese Erscheinung zum größten Teil erklären. Dies zeigt am deutlichsten die umgekehrte Versuchsanordnung (Abb. 1 u. 2), wo durch Colistriche Milzbrandstriche gezogen wurden.

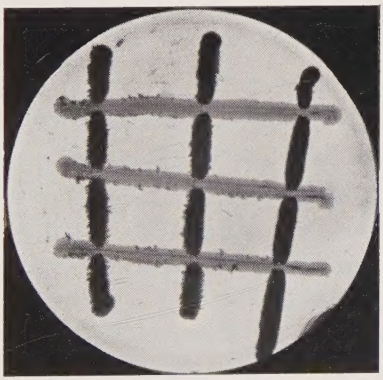


Abb. 1.

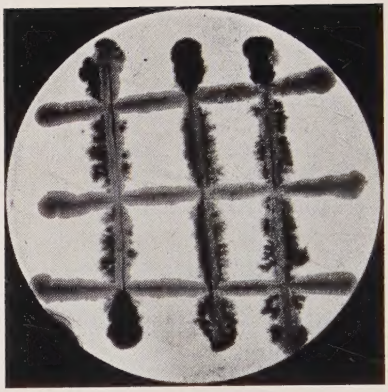


Abb. 2.

2. Schmierplattenverfahren.

1 Öse einer 24stünd. Colikultur wurde mit 1 Öse einer 24stünd. Milzbrandkultur vermengt und mit Spatel auf gewöhnlichen Agar ausgestrichen. Wiederholung desselben Versuches mit 16stünd., noch nicht versporten Milzbrandkulturen.

Nach 24 Stunden bei 37° sieht man mit bloßem Auge in dem Colirasen typische Milzbrandkolonien, die bei weiterer Bebrütung größer werden. Ein Verschwinden bei längerer Bebrütung sahen wir nicht.

3. Versuche in Nährflüssigkeiten.

a) In 10—12 ccm alkalische Brühe kam je 1 Öse einer 18stünd. Coli- und Milzbrandkultur. Nach 2, 4 und 5 Tagen bei 37° gelang durch einfaches Ausstreichen einer Öse, die in der üblichen Weise auch aus dem Bodensatz entnommen war, auf Agarplatten der Nachweis von Milzbrandkeimen.

b) Auch die Aussaat von Milzbrandbazillen und Coli in Leber-Leberbrühe in gleicher Versuchsanordnung hatte zur Folge, daß beide Keime nach 4, 6, 8, 12, 15 und 17 Tagen herausgezüchtet werden konnten. Wir möchten ausdrücklich betonen, daß wir uns dabei keine besondere Mühe zu geben brauchten, obwohl nach unseren Erfahrungen Leber-Leberbrühe ein außeror-

dentlich schlechter Nährboden für Milzbrandbazillen ist, und es in ihm nie zur Sporenbildung kam. Die Wiederholung dieses Versuches ergab auch in 28 Aussaaten 7mal zunächst Mißlingen des Milzbrandnachweises, so daß wir schon Besonderheiten vermuteten. Es ist aber lediglich die Zahl der entnommenen Ösen Ursache dieses „Fehlens der Milzbrandbazillen", so daß wir auch in diesen 7 Röhrchen bei weiterer Aussaat größerer Mengen mühelos Milzbrandbazillen nachweisen konnten.

c) Schließlich haben wir auch Milzbrandsporen an Seidenfäden antrocknen lassen und sie bei 37° in Colibrühe gehalten. Nach 4, 9, 14, 16, 19 und 26 Tagen wurden die Milzbrandbazillen nachgewiesen.

d) Alle übrigen Versuchsanordnungen, wie mit verschieden erhitzter Brühe, mit Coliemulsionen zeigten völlige Übereinstimmung mit den Angaben von Gundel und seinen Mitarbeitern.

Auch dann, wenn wir unsere Colistämme in eine 24stünd., 1, 3, 5 und 6 Tage alte Milzbrandbrühekultur verimpften, konnten nach 24 Stunden, 2 und 5 Tagen Bebrütung bei 37° Milzbrandbazillen festgestellt werden.

4. Sogen. Tropfenkulturen.

a) Über eine gleichmäßig mit Coli beimpfte Agarplatte wurde nach 24 Stunden bei 37° ein Tropfen einer 18stünd. Milzbrandbrühe ablaufen lassen. Bei allen unseren Versuchen ohne Ausnahme zeigten sich im Verlaufe des Tropfens nach 24 Stunden 37° feine Ausläufer, „Flockenbildungen", die nach weiterer Bebrütung bei 37° Zunahme des Wachstums zeigten, so daß es in der Tropfenbahnmitte, am Tropfenbahnrand, selbst im Colirasen zur Auskeimung von typischen Milzbrandkolonien kam.

b) Die umgekehrte Versuchsanordnung, also zuerst gleichmäßige Beimpfung mit Milzbrandbazillen, jedoch nicht bebrütet, also Erschwerung der Versuchsbedingungen, Darüberlaufenlassen einer 24 Stunden bei 37° bebrühten Colibrühe zeigte bei 2 Colistämmen makroskopisch angedeutet Antagonismus, jedoch konn-

ten wir stets aus der anscheinend milzbrandfreien Zone und selbst aus der Tropfenbahnmitte den Milzbrandbazillus wieder gewinnen (Abb. 3).

Abb. 3.

c) Auf Agar wird 1 Öse Colischrägagarkultur ausgespatelt. Man läßt auf dieser Platte 1 ccm einer Aufschwemmung von 1 Öse Milzbrand in 100 ccm physiol. Kochsalzlösung verlaufen. Es entspricht dies nach unseren Zählungen einem Verhältnis Milzbrand : Coli wie 1 : 200. Es ergaben sich dann dementsprechend Milzbrandkolonien. Von Coliantagonismus ist nichts zu merken (Abb. 4).

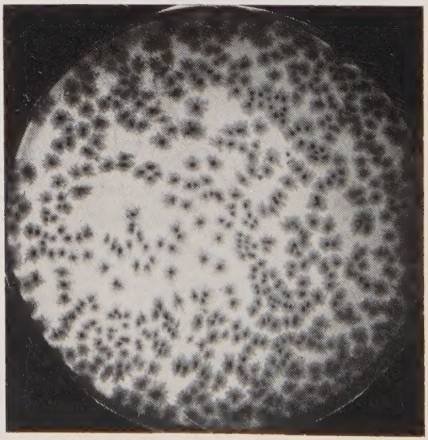
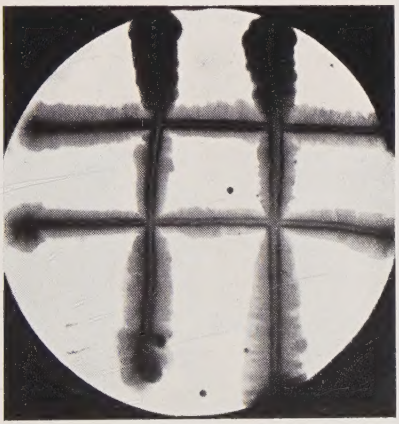


Abb. 4.
(n. 3täg. Bebrütung bei 37°.)

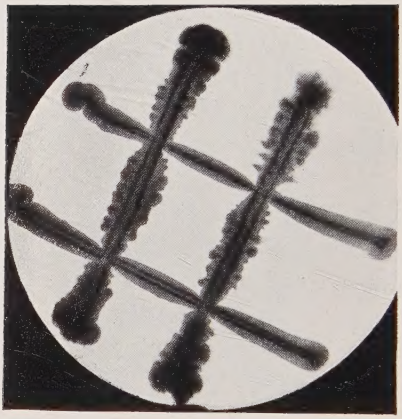
5. Sauerstoffversuche.

Die Annahme, daß der Sauerstoffbedarf der Milzbrandbazillen eine Erklärung für den durch Coli bewirkten Antagonismus sei, stammt von Gundel und Habs: „Wir haben in größeren Versuchsreihen geprüft, ob sich vielleicht auch Choleravibrionen und Staphylokokken Milzbrand gegenüber antagonistisch verhalten. Da diese Versuche negativ ausfielen, erübrigt es sich, näher darauf einzugehen."

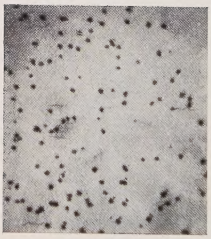
a) Wir haben in fast reiner Sauerstoffatmosphäre unsere bisherigen Versuche mit 9 Coli- und 7 Milzbrandstämmen wiederholt und dabei festgestellt, daß man von einem Antagonismus Coli — Milzbrand, wenn man die quantitativen Verhältnisse bedenkt, kaum noch reden kann (Abb. 5, 6; 7, 8).



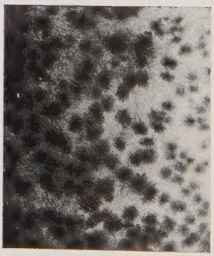
ohne O_2
Abb. 5.
(48 Stunden 37°).



in O_2
Abb. 6.



ohne O_2
Abb. 7.



in O_2
Abb. 8.

b) Umgekehrt kann man durch Evakuieren sehr deutlichen Antagonismus des Coli erzielen, selbst bei Stämmen, die bei Luftzutritt sehr schlecht antagonistisch wirken (Abb. 9, 10).

nicht evakuiert
Abb. 9.

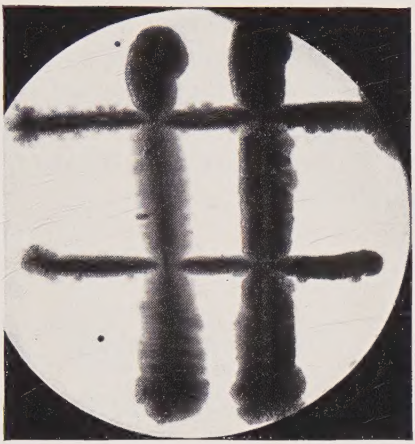
evakuiert
Abb. 10.

c) Unsere letzten Versuchsreihen sollten zeigen, ob wir Methylenblau als Indikator für Sauerstoffzehrung benützen können. Wir nahmen Agarnährboden mit Zusatz von Methylenblau 1 : 1000, : 10000, : 100000, : 500000, : 5000000. Selbst bei Luftzutritt zeigte sich, daß zwar unsere Colistämme auf allen Verdünnungen der Methylenblauplatten gut wuchsen, aber Milzbrand noch in der Verdünnung 1 : 100000 so stark gehemmt wurde, daß höchstens ganz kleine Kummerkolonien angingen. Diese Beobachtungen sollen weiter ausgedehnt werden.

d) Auch die Dicke des Nährbodens hatte keinen Einfluß auf unsere Ergebnisse. Ob wir 45 ccm Agar nahmen oder 15 ccm, zeigte zwar Unterschiede im Wachstum von B.coli und Milzbrand, aber entsprechend Abnahme oder Zunahme. Der Antagonismus wurde dadurch weder verstärkt noch verringert.

e) Schließlich möchten wir noch darauf hinweisen, daß der Antagonismus des Bact.coli sich in gleicher Weise auch bei Benützung von anderen Sporenbildnern der Erd- und Heubazillengruppe zeigte. Abb. 11 und 12 geben Versuche mit einem beweglichen Pseudomilzbrandstamm unter gewöhnlichen Verhältnissen und bei starkem Sauerstoffgehalt wieder.

ohne O_2
Abb. 11.



in O_2
Abb. 12.

Auch mit Bazillus sphaericus, Bac. mesentericus ruber bekamen wir ganz ähnliche Bilder.

Auch ein anderer, viel benützter Sauerstoffzehrer, Bact. prodigiosum, wirkte sich antagonistisch in ähnlicher Weise aus wie Bact coli. (Abb. 13).

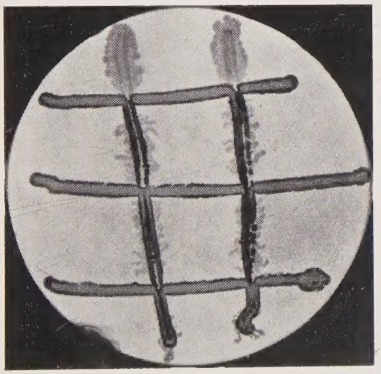


Abb. 13.

Schließlich weisen wir noch darauf hin, daß alle unsere Versuche möglichst quantitativ gestaltet wurden. Unsere Öse Bact.-coli-Brühe hatte einen durchschnittlichen Keimgehalt von 4,5 Millionen, die entsprechend gründliche geschüttelte von B. anthracis 2,7 Millionen. Auch beim Ausstreichen der Gitterplatten usw. muß man daran denken, die Ergebnisse auch von der quantitativen Seite her wenigstens zu schätzen.

Zusammenfassung.

1. Der von Gundel und seinen Mitarbeitern beobachtete Antagonismus von B. coli gegenüber Milbrand führt in unseren Versuchen auf Nährböden und in Nährflüssigkeiten nur so weit, daß auch nach Tagen und Wochen eine Abtötung von Milzbrandkeimen nicht festgestellt werden konnte.

2. Durch frische und alte Colistämme wurden in sogen. Gitterplattenkulturen die Milzbrandbazillen in ihrem Wachstum oft stärker behindert als mengenmäßig zu schätzen war. (Antagonismus). Ganz unterdrückt wurden sie sehr selten.

3. Eine annähernd reine Sauerstoffatmosphäre hebt fast stets diesen Antagonismus des B. coli gegenüber Milzbrand auf, Sauerstoffentzug fördert ihn.

4. Der Antagonismus des B. coli erstreckt sich auch auf verwandte, apathogene Sporenbildner. An Stelle von B. coli kann als Antagonist auch B. prodigiosum treten.

Zum Schlusse ist es mir eine angenehme Pflicht, Herrn Prof. Dr. M. Knorr für die Überlassung des Themas, die vielfachen Anregungen und Ratschläge und die liebenswürdige Unterstützung meinen besonderen Dank auszusprechen.

Schrifttum.

Gundel M. und Kliewe H.: Zentrabl. f. Bakt. O. **124**, 519.

Gundel M. und Habs: ebenda O. **104**, 463.

Gundel M. und Hirnstedt: ebenda 1925, S. 1674; M. m. W.

Elinger und Tulczynska: Zeitschr. f. Hygiene **113**, 762.

Sanfelice Franzesco: Arch f. Hyg. 1933, **110**, 348.

Rizzi Stalo: Zeitschr. f. Immunitätsforschg. **82**, 380.

Wagner Werner: ebenda **63**, 483.

Gundel M. und Wagner W.: ebenda **69**, 63.

Isabolinski und Sobolewa: Zentralbl. f. Bakt. O. **133**, 107.

Ich versichere hiermit ehrenwörtlich, daß ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne jede Hilfe verfaßt, auch keine anderen Quellen und Hilfsmittel als die darin angegebenen benutzt habe.

René Schubert.

Lebenslauf.

Ich bin geboren am 25. September 1910 in Toulon als Sohn des Kaufmanns Anton Schubert und seiner Ehefrau Margarete geb. Pfennig. Der Ausbruch des Weltkrieges zwang meine Eltern zur Rückkehr nach Deutschland. In Würzburg, der Heimatstadt meines Vaters, besuchte ich die Volksschule und das Neue humanistische Gymnasium bis zum Abitur. Dem Studium der Medizin oblag ich in Berlin und Würzburg.

René Schubert.